

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :

C07K 5/08

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/31119

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

2. Juni 2000 (02.06.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH98/00498

(22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1998  
(19.11.98)(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PEPTI-  
CHEMIO AG [CH/CH]; Rabbentalstrasse 83, CH-3000  
Bern 25 (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MEHLEM, Francesco  
[IT/CH]; Lindenhofstrasse 2, CH-3048 Worblaufen (CH).  
DI VITTORIO, Pietro [IT/IT]; Via A. Storza, 65, I-20100  
Milano (IT).) Anwalt: BOVARD AG; Optingenstrasse 16, CH-3000 Bern 25  
(CH).(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, IL, JP, US, europäisches  
Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING L-PROLYL-L-M-SARCOLYSYL-L-P-FLUOROPHENYLALANINE AND DERIVATIVES  
THEREOF(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON L-PROLYL-L-M-SARCOLYSYL-L-P-FLUORPHENYLALANIN  
UND VON DERIVATEN DAVON

(57) Abstract

The invention relates to the production of L-prolyl-L-m-sarcosyl-L-p-fluorophenylalanine and to the lower alkyl ester and/or acid addition salts thereof. To this end L-p-fluorophenylalanine presenting a protected carboxyl group is reacted with L-m-sarcosine presenting a protected amino group, preferably during cooling in an anhydrous medium and in the presence of dicyclohexylcarbodiimide. This yields L-m-sarcosyl-L-p-fluorophenylalanine presenting a protected amino group and a protected carboxyl group. The amino protective group is then split off, resulting in the formation of L-m-sarcosyl-L-p-fluorophenylalanine presenting a protected carboxyl group. The resulting product is reacted with proline presenting a protected amino group in the presence of dicyclohexylcarbodiimide, so that L-prolyl-L-m-sarcosyl-L-p-fluorophenylalanine with a protected amino group is obtained. Finally the amino protective group is split off and possibly the lower alkyl ester group split off and/or the resulting compound transformed into an acid addition salt.

(57) Zusammenfassung

Es werden L-Prolyl-L-m-sarcosyl-L-p-fluorophenylalanin, der Niederalkylesters und/oder Säureadditionssalzen davon hergestellt. Hierzu wird L-p-Fluorophenylalanin mit einer geschützten Carboxyl-Gruppe mit L-m-Sarcosin mit einer geschützten Aminogruppe vorzugsweise unter Kühlung in einem wasserfreien Medium in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt, wobei L-m-Sarcosyl-L-p-fluorophenylalanin mit einer geschützten Aminogruppe und einer geschützten Carboxyl-Gruppe erhalten wird. Anschließend wird die Aminoschutzgruppe abgespalten, unter Bildung von L-m-Sarcosyl-L-p-fluorophenylalanin mit einer geschützten Carboxyl-Gruppe. Das erhaltene Produkt wird mit Prolin mit einer geschützten Aminogruppe in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt. Es wird L-Prolyl-L-m-sarcosyl-L-p-fluorophenylalanin mit einer geschützten Aminogruppe erhalten. Schliesslich wird die Amino-Schutzgruppe abgespalten und gegebenenfalls die Niederalkylestergruppe abgespalten und/oder die erhaltene Verbindung in ein Säureadditionssalz übergeführt.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

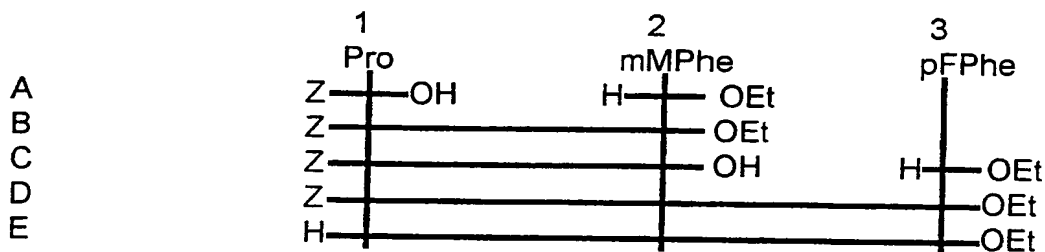
## Verfahren zur Herstellung von L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin und von Derivaten davon

- Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutisch aktiven Peptidverbindung, die L-m-Sarcolysin als Aminosäurebaustein enthält. Der Wirkstoff dient insbesondere zur Chemotherapie gegen Krebsleiden, besonders gegen Melanome. Bei Verwendung einer Trägersubstanz auf Basis von Cyclodextrin wird der Wirkstoff verzögert freigesetzt, was eine genügende Bioverfügbarkeit während einer ausreichend langen Zeitdauer ermöglicht.
- Ein Komplex von sechs Peptiden, die m-L-Sarcolysin enthalten, ist unter dem Warennamen „Peptichemio“ (Istituto Sieroterapico Milanese S. Belfanti, Milano, IT) für die Chemotherapie gegen Krebs bekannt geworden. Es wurde gefunden, dass die Aktivität der einzelnen Peptide verschieden ist und dass besonders ein Vertreter eine sehr hohe Toxizität für Melanomzellen aufweist. Die Peptide sind eine Entwicklung, welche mit dem Produkt „Melphalan“, d.h. 4-[bis(2-Chlorethyl)]-amino-L-phenylalanin begonnen hat. Es wurde gefunden, dass dieses Produkt eine zytostatische Wirkung hat und sowohl für die Myelom- als auch für die Melanomtherapie eingesetzt werden kann. Zur Weiterentwicklung des Wirkstoffes wurden Derivate des Produktes hergestellt. Daraus resultierte auch das L-m-Sarcolysin [= m-{Di-2-chlorethyl)amino}-L-phenylalanin], das weiter deriviert wurde, indem Peptide hergestellt wurden, welche die modifizierte Aminosäure als Baustein enthielten. Eine Kombination der 6 Oligopeptiden L-Seryl-L-p-fluorphenylalanyl-L-m-sarcolysyl-ethylester; L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester; L-m-Sarcolysyl-N-nitro-L-arginyl-L-norvalin-ethylester; L-p-Fluorphenylalanyl-L-m-sarcolysil-L-asparagin-ethylester; Fluorphenylalanyl-glycyl-L-m-sarcolysyl-norvalin-ethylester und L-m-Sarcolysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-m-sarcolysyl-L-histidin-methylester bildete das aktive Prinzip der Antitumormittel „Peptichemio“. Von den 6 Peptiden haben sich das L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin (PSF) und seine Niederalkylester als besonders geeignet erwiesen.

- Es wurde gefunden, dass PSF eine beträchtlich höhere Zytotoxizität im Vergleich zum Peptichemio selbst zeigte (R. Levenson, et al., Radiumhemmet, Karolinska Hospital, Stockholm SE, Eur. J. Cancer Clin. Oncol.; 23: 6, 783-788, 1987). Gemäss diesen Studien wurde gefunden, dass
- 5 das Peptid L-Propyl-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin (PSF) 35 x bzw. 28 x toxischer gegen RPMI 8322 Melanomzellen war als Melphalan bzw. m-Sarcolysin. Ähnliche Unterschiede zwischen den Wirkstoffen wurden auch für andere Melanomzelllinien gefunden.

- Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur
- 10 Herstellung von PSF Verfügung zu stellen, das eine wirtschaftliche und sichere Herstellung des Wirkstoffes ermöglicht.

Die Herstellung einer solchen Verbindung ist in den Druckschriften BE-A-775775 und US-A-3 814 746 beschrieben. Die beschriebene Herstellung erfolgt nach dem nachstehenden Schema 1:



15

Pro = Prolin  
 mMPhe = m-[Di(2-chlorethyl)]-amino-L-phenylalanin  
 pFPhe = p-Fluor-L-phenylalanin  
 Z = Benzyloxycarbonyl

- 20 Das obige Schema zeigt in Stufe A die Kondensation des N-Carbobenzoxy-L-prolin mit dem Ethylester von m-[Di-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin, wobei das entsprechende geschützte Peptid entsteht, wie dies bei Stufe B im Schema 1 gezeigt ist.

In Stufe C erhält man das N-Carbobenzoxo-L-prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin aus dem N-Carbobenzoxo-L-prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalaninethylester und anschliessend führt man die Kondensation dieser Verbindung mit p-Fluor-L-phenylalaninethylester durch, wobei man in Stufe D  
5 des Schemas 1 den Carbobenzoxo-L-prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanin-p-chlor-L-phenylalaninethylester erhält.

Man eliminiert darauf die Schutzgruppe, wobei man in Stufe E des Schemas 1 ankommt, wobei das Endprodukt der L-Prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)amino]-L-alanin-p-fluor-L-phenylalaninethylester ist.

- 10 Die Reaktionsbedingungen sind solche, welche im allgemeinen bei Peptidsynthesen verwendet werden. Beim obigen Verfahren wird das Endprodukt mit einer Ausbeute von 30 % erhalten, bezogen auf das Ausgangsprodukt m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalaninethylester, wobei die Reinigung mindestens eines Zwischenproduktes durch  
15 Säulenchromatographie auf Kieselgel durchgeführt werden muss.

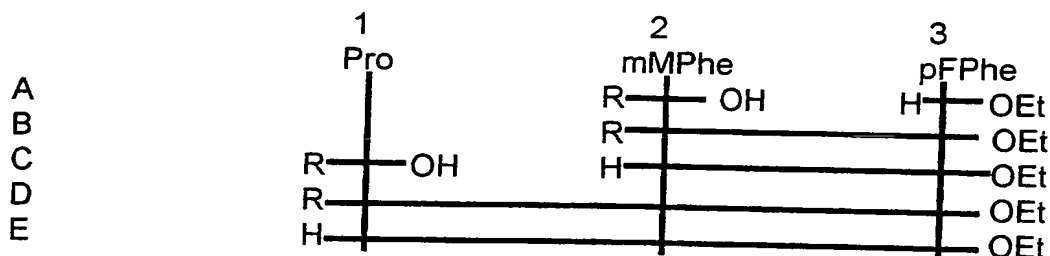
Tatsächlich ist das Verfahren industriell anwendbar, jedoch ist es verhältnismässig kompliziert und führt zu einer eher ungenügenden Ausbeute.

- Zieht man die Eigenschaften des Endproduktes PSF-Hydrochlorid in Betracht, ist die Verwirklichung eines anderen Herstellungsverfahrens, welches leicht  
20 industriell angewandt werden kann, welches bessere Ausbeuten gegenüber demjenigen des Standes der Technik ergibt, eine aussergewöhnlich wichtige und interessante Aufgabe der vorliegenden Erfindung.

- Es wurde gefunden, dass das erfindungsgemässe Herstellungsverfahren von PSF, das eine andere Reaktionsfolge verwendet, dem Verfahren des Standes  
25 der Technik überlegen ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demzufolge das im Patentanspruch 1 definierte Verfahren zur Herstellung von L-Prolyl-L-m-sarcosyl-L-p-fluorphenylalanin und von Estern und/oder Salzen davon.

Das erfindungsgemässe Verfahren erfolgt gemäss dem nachstehenden Schema 2:



Pro = Prolin

5 mMPhe = m-[Di(2-chlorethyl)]-amino-L-phenylalanin (=L-m-Sarcosylsin)

pFPhe = p-Fluor-L-phenylalanin

R = Benzyloxycarbonyl, t-Butoxycarbonyl (BOC) oder  
9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)

10 Das Verfahren umfasst folgende Verfahrensschritte, die im obigen Schema 2 dargestellt sind:

- a) Kondensation von R-m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanin mit p-Fluor-L-phenylalaninethylester, wobei R-m-[Di-2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanyl-p-fluor-L-phenylalaninethylester erhalten wird;
- b) Abspaltung der Schutzgruppe R;
- 15 c) Kondensation des im Schritt b) erhaltenen Produktes mit R-L-Prolin, wobei R-L-Prolyl-m-[di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanyl-p-fluor-L-phenylalaninethylester erhalten wird;
- d) Abspaltung der Schutzgruppe R und Synthese des Hydrochlorides;
- 20 R kann Benzyloxycarbonyl, t-Butyloxycarbonyl oder 9-Fluorenylmethoxycarbonyl sein. R ist vorzugsweise eine Benzyloxycarbonylgruppe.

Das Verfahren gemäss der vorliegenden Erfindung zeigt eine Ausbeute von insgesamt 50 % bezogen auf das Ausgangsprodukt R-m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanin.

Das Verfahren gemäss der vorliegenden Erfindung zeigt einen grossen Vorteil zur Durchführung der Synthese des Endproduktes, da kristalline Zwischenprodukte erhalten werden, welche aussergewöhnlich leicht durch Kristallisation gereinigt werden können.

- 5 Die Merkmale und die Vorteile des erfindungsgemässen Verfahrens sollen zum besseren Verständnis durch die nachstehende Beschreibung erläutert werden. Das Tripeptid, welches nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellt wird, wird gemäss dem obigen Schema 2 hergestellt. Darin ist R eine Benzyloxycarbonyl oder t-Butoxycarbonylgruppe (BOC) oder  
10 eine 9-Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc).

Das Verfahren sieht, wie aus dem Schema 2 hervorgeht, in Stufe A die Kondensation von R-m-[Di-2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanin mit dem Ethylester des p-fluorphenylalanins vor, wobei in Stufe B das entsprechende geschützte Tripeptid entsteht.

- 15 In Stufe C wird die Benzyloxycarbonylgruppe entfernt, und durch eine Kondensation des R-L-Prolins mit m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanyl-p-fluor-L-phenylalaninethylester wird in Stufe D des Schemas 2 das R-L-Prolyl-m-[Di-2-chlorethyl)amino]-L-phenylalanyl-p-fluor-L-phenylalaninethylester erhalten.

- 20 Die Schutzgruppe R wird in Stufe E des Schemas 2 abgespalten, wobei das Endprodukt L-prolyl-m-[Di-(2-chlorethyl)amino]-phenylalanyl-p-fluor-phenylalaninethylester ist.

Die Reaktionsbedingungen sind solche, wie sie im allgemeinen bei der Peptidsynthese üblich sind.

- 25 Das Peptid L-Prolyl-m-sarcosyl-L-p-fluorphenylalanin (PSF) wird vorzugsweise in Form von Hydrochloriden oder Hydrobromiden hergestellt.

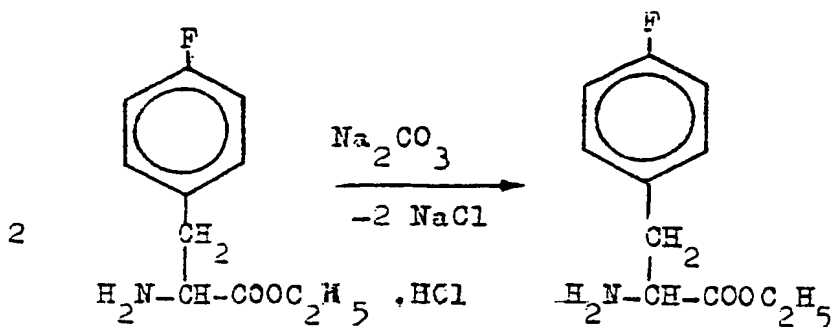
Das nachstende Beispiel dient der Erläuterung der vorliegenden Erfindung.

Beispiel:

Synthese von L-prolyl-L-m-sarcosyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester-hydrochlorid

a) N-Carbobenzoxy-L-m-sarcosyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester

- 5 52,5 g L-p-Fluorphenylalaninethylester Hydrochlorid werden mit 75 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Natriumcarbonat) gesättigte Lösung und 150 ml  $\text{CHCl}_3$  behandelt. Die Mischung wird ausgeschüttelt und die organische Phase wird getrennt und aufbewahrt. Die wässrige Phase wird mit 75 ml  $\text{CHCl}_3$  ein zweites Mal ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformextrakte werden gemischt und
- 10 einmal mit Wasser gewaschen, und dann von der wässrigen Phase getrennt und auf wasserfreiem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Die Konzentration von Aminosäureester wird durch eine Titration mit  $\text{HClO}_4$  (Perchlorsäure) bestimmt. Die Ausbeute entspricht ungefähr dem theoretischen Wert; sie liegt bei 98%.

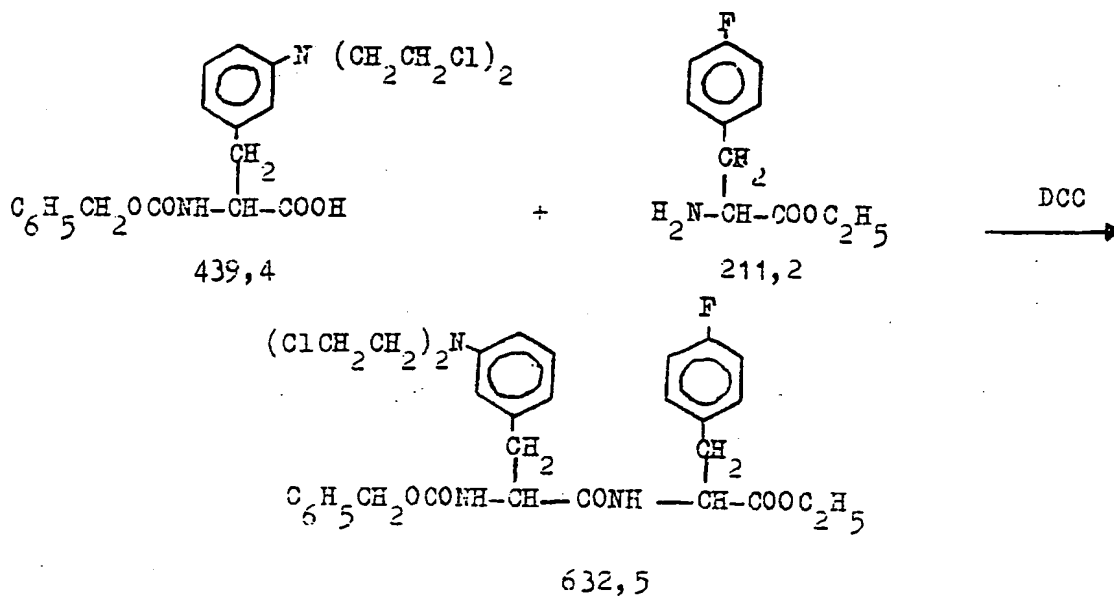


- 15 286,5 ml einer Chloroformlösung, die 0,1905 Mol L-p-Fluorphenylalaninethylester enthält, werden mit 83,7 g (0,1905 Mole) N-Cbzo-L-m-sarcosylin versetzt. Die Lösung wird auf einem Eisbad gekühlt.

- 20 Der gekühlten Lösung werden unter Rühren 41,25 g (0,200 Mol Dicyclohexylcarbodiimid - DCC) und 60 ml Chloroform dazugegeben, wobei die Lösung während 30 min. unter gleichzeitiger Kühlung ständig gerührt wird. Unter Umständen kann die Mischung zu fester Masse erstarren. In diesem Fall wird die Masse durch Zugabe von 150 ml Chloroform wieder flüssig gemacht, wobei sie unter leichtem Erwärmen gerührt wird. Auf diese Weise wird die



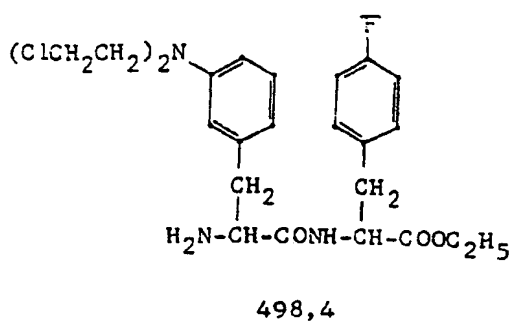
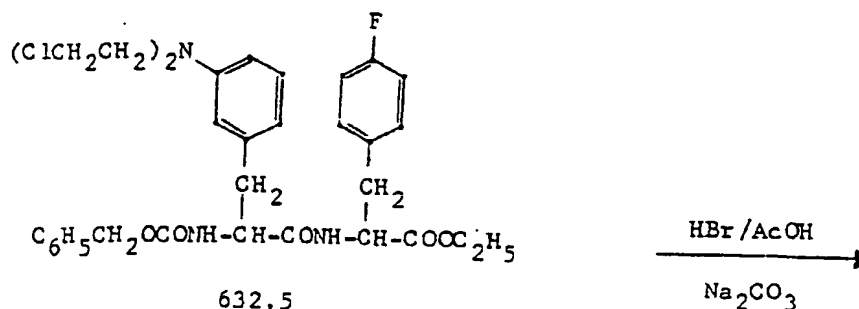
- Auflösung des ausgefallenen Produktes beschleunigt. Die Reaktion ist 2 h nach Zugabe des DDC beendet. Das Reaktionsende wird durch TLC-Kontrolle festgestellt (Dünnschichtchromatographie; Kieselgel G-Schicht, Lösungsmittel: Chloroform + Aceton 9:1, Sichtbarmachung durch Besprühen mit verdünnter, saurer  $\text{KMnO}_4$ -Lösung). Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird durch Filtration abgetrennt. Die Lösung wird zuerst mit wenig Wasser, dann mit gesättigter  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung gewaschen. Die Chloroformlösung wird noch einmal mit Wasser ausgeschüttelt und dann mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum verdampft und entfernt. Nach Trocknung werden 140,25 g leicht gelblich gefärbtes Produkt erhalten (Ausbeute 98,3%). Die gewonnene Substanz hat einen Schmelzpunkt von 123-124,5°C und ist chromatographisch homogen. Durch Kristallisation von 4,5 g Substanz aus 37,5 ml Ethylalkohol werden 3,75 g helleres Produkt gewonnen mit einem Schmelzpunkt von 125-126 °C.  $\alpha_D^{20}$ : 27.7 ( $c = 2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).



15

Analyse für  $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{FN}_3\text{O}_5$   
 N% = 6,67 (berechnet 6,66)  
 Cl% = 11,5 (berechnet = 11,2)

b) L-m-Sarcosyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester

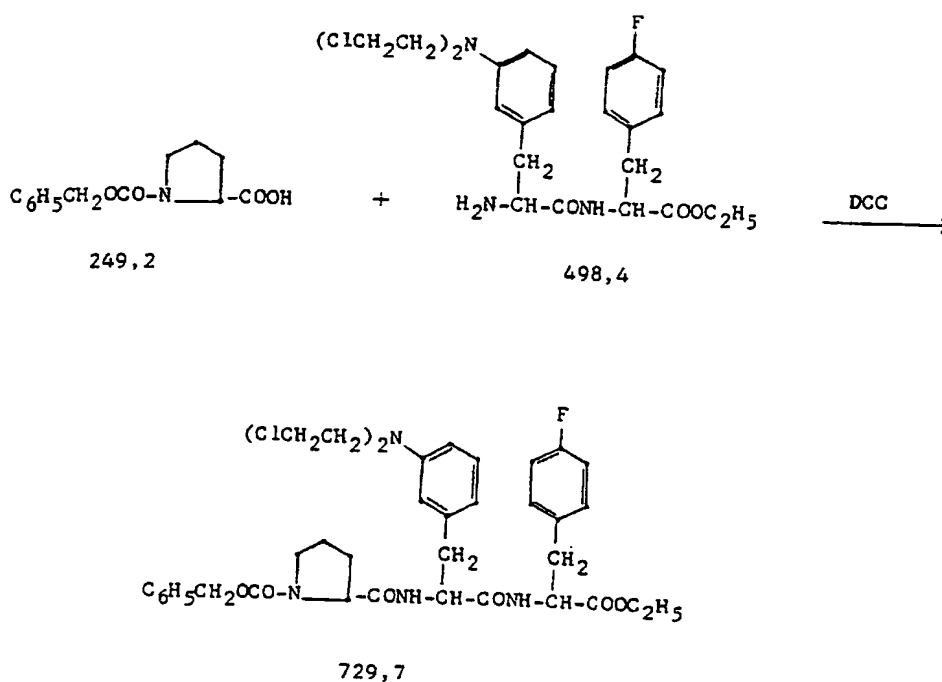


- Unter Ausschluss der Luftfeuchtigkeit werden zu 390 g (0,616 mol) die M-Carbobenzoxy-L-m-sarcosyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester unter
- 5 langsamem Rühren 600 ml HBr in Eisessig (33 %) zugegeben. Die Auflösung und das Aufhören der CO<sub>2</sub>-Entwicklung findet nach 40 Minuten statt. Es wird während weiteren 20 Minuten unter Rühren stehengelassen und mit ca. 400 ml Ether verdünnt. Man giesst das gesamte in 5 l Ether, welcher unter ständigem Rühren gehalten wird, dekantiert und wäscht das ausgefallene Öl 2 x mit 2 l
- 10 Ether unter Dekantieren. Das Öl wird unter Rühren mit 4 l Wasser behandelt und man erhält einen Feststoff, welcher nach ca. 30 min. durch Filtration gesammelt wird und vollständig mit insgesamt 1500 ml Wasser und 500 ml Ether gewaschen wird. Das so erhaltene Bromhydrat wird in 2 l Ethylacetat suspendiert und unter Rühren mit 450 ml gesättigter Natriumcarbonatlösung

- behandelt, derart bis die Lösung alkalisch ist. Nachdem die Auflösung stattgefunden hat, filtriert man auf der Nutsche, um den suspendierten Dicylohexylharnstoff (sehr wenig) zu entfernen. In einem Scheidetrichter trennt man die organische Schicht von der wässerigen Phase ab, und die wässrige
- 5 Phase wird mit weiteren 500 ml Ethylacetat extrahiert. Die gereinigten Extrakte werden mit 300 ml Wasser gewaschen,  $\text{Na}_2\text{CO}_4$  getrocknet und mit Norit behandelt. Es wird filtriert und das Filtrat wird unter dem Vakuum getrocknet ( $40^\circ\text{C}$ ). Der Rückstand wird noch vor seiner Festigung in 500 bis 1000 ml Ether aufgenommen. Aus der erhaltenen Lösung wird während der Nacht ein weisses
- 10 Produkt ausgefällt. Ausbeute: 247 g (80,4 %)
- Smp.  $100 - 102^\circ\text{C}$ .

- 15  $\alpha_D^{20} = -7,5^\circ$  ( $c=2$ , Chloroform)  
TLC (BuOH/AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$  65:15:25;  $\text{KMnO}_4$  verdünnt):  
Eine Bande,  $R_f = 0,74$   
Analyse für  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{FN}_3\text{O}_3$   
 $\text{N}\% = 8,34$  (berechnet 8,43)  
 $\text{Cl}\% = 14,1$  (berechnet 14,2)

c) N-Carbobenzoxy-L-prolyl-L-m-sarcosyl-L-p-fluorophenylalaninethylester

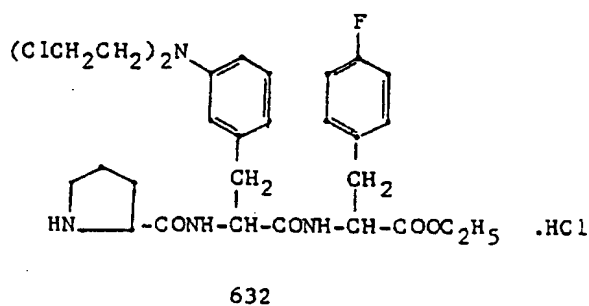
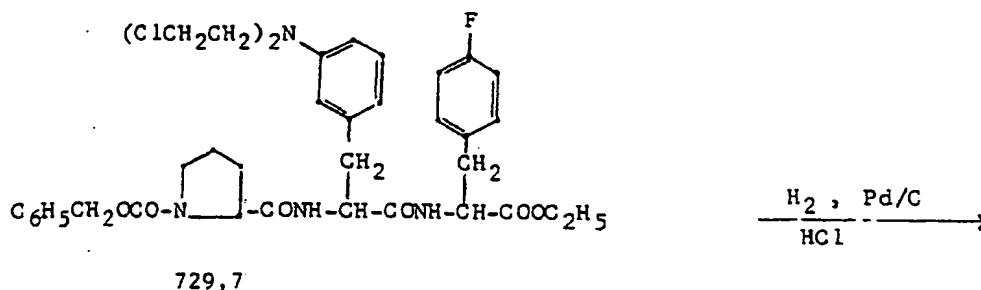


- Eine Mischung von 249 g (0,5 mol) L-m-sarcosyl-L-p-
- 5 fluorophenylalaninethylester, 125 g (0,5 mol) N-Cbzo-L-Prolin und 109 g (0,525 mol) DCC in 3000 ml Chloroform wird während 30 Minuten unter Rühren stehen gelassen, mit externer Kühlung während weiteren 90 Minuten bei Zimmertemperatur (TLC, Silikagel G, Chf/Me<sub>2</sub>CO 9:1; oder mit BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O 65:15:25; KMnO<sub>4</sub>, verdünnt, sauer). Nach der Entfernung des
- 10 Dicyclohexylharnstoff durch Filtration wird das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft und der Rückstand wird noch in flüssigem Zustand in 800 ml Ether gegossen. Von der erhaltenen Lösung fällt langsam das Produkt aus, welches auf einem Filter gesammelt wird. Ausbeute 290 g (78,5%).
- Smp. = 148-150°C,  $\alpha_D^{20} = -42,4^\circ$  (c=2; Chloroform)

Analyse für  $C_{37}H_{43}FCl_2N_4O_6$   
 N% = 7,78% (berechnet 7,68)  
 Cl% = 9,6 (berechnet 9,7)

d) L-Prolyl-L-m-sarcosyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester-hydrochlorid

5



Eine Mischung von 157,5 (0,261 mol) N-Carbobenzoxy-L-prolyl-L-m-sarcosyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester und 30 g Palladium auf Kohlenstoff 5% wird suspendiert unter einem Stickstoffstrom in 15 ml Eisessig und 1750 ml  
 10 Methanol. Die Reaktionsmischung wird unter Rühren gehalten und wird unter einem Wasserstoffstrom reduziert. Nach der Beendigung der  $\text{CO}_2$ -Entwicklung (nach 4 -5 Stunden) wird eine TLC-Chromatographiekontrolle durchgeführt (Kieselgel G), wobei mit Chloroform-Aceton 9:1 eluiert wird und mit verdünntem  $\text{KMnO}_4$  sichtbar gemacht wird.

Nachdem der Entfernung des Katalysators durch Filtration wird das Filtrat mit konzentrierter ethanolischer HCl in stöchiometrischer Menge oder wenig mehr angesäuert. Der weisse, kristalline Niederschlag, welcher sich langsam bildet, wird auf einem Filter gesammelt und mit Ethanol oder mit Ether  
5 gewaschen: 85 g. Das Filtrat wird praktisch bis zur Trockenheit konzentriert und der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert: 25 g. Vollständige Ausbeute: 110 g (80, 5%); Smp. 122 - 124 °C (Änderung des Aggregatzustandes)

10  $\alpha_D^{20} = -13,0^\circ \pm 0,5$  (c= 2; MeOH)  
TLC (Kieselgel G; BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O 65:15:25; KMnO<sub>4</sub> verdünnt: eine Bande R<sub>f</sub> = 0,54.  
Analyse für C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>3</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
N % = 8,93% (berechnet 8,86)  
Cl % = 16,7 % (berechnet 16,8)  
Cl-% = 5,65% (berechnet 5,6)

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin, eines Niederalkylesters und/oder von Säureadditionssalzen davon dadurch gekennzeichnet, dass L-p-Fluorphenylalanin mit einer geschützten Carboxyl-Gruppe mit L-m-Sarcolysin mit einer geschützten Aminogruppe und einer aktivierten Carboxy-Gruppe umgesetzt wird, wobei L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin mit einer geschützten Aminogruppe und einer geschützten Carboxy-Gruppe erhalten wird und anschliessend die Aminoschutzgruppe abgespalten wird; danach das erhaltene L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin mit einer geschützten Carboxy-Gruppe mit Prolin mit einer geschützten Aminogruppe und einer aktivierten Carboxy-Gruppe umgesetzt wird, wobei L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin mit einer geschützten Aminogruppe erhalten wird und die Amino-Schutzgruppe abgespalten und gegebenenfalls die Niederalkylestergruppe abgespalten oder in eine andere Estergruppe übergeführt wird und/oder die erhaltene Verbindung in ein Säureadditionssalz übergeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass die Kondensation unter Kühlung in einem wasserfreien Medium durchgeführt wird, z.B. in Chloroform.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die aktivierten Carboxy-Gruppen durch Behandlung mit Dicyclohexylcarbodiimid aktiviert wurden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Carboxy-Schutzgruppe von L-p-Fluorphenylalanin eine Niederalkylestergruppe, vorzugsweise eine Ethylestergruppe ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminoschutzgruppe des L-m-Sarcosins eine Carbobenzoxy-Gruppe ist.
- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Abspaltung der Aminoschutzgruppe des L-m-Sarcosyl-L-p-fluorphenylalanins mit einer geschützten Aminogruppe durch Behandlung mit Bromwasserstoff in Eisessig durchgeführt wird.
- 10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Abspaltung der Aminoschutzgruppe des L-Prolyl-L-m-sarcosyl-L-p-fluorphenylalanins mit einer geschützten Aminogruppe durch Reduktion mit Wasserstoff in Gegenwart von Palladium auf Kohlenstoff.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CH 98/00498

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 99 02177 A (PEPTICHEMIO AG ; MEHLEM FRANCESCO (CH)) 21 January 1999 see page 6 - page 9	1-7
A	BE 775 775 A (BELFANTI IST SIEROTERAP MILAN; BELFANTI) 16 March 1972 cited in the application	
A	US 3 814 746 A (DE BARBIERI A) 4 June 1974 cited in the application	

☐

Further documents are listed in the continuation of box C.

☒

Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 May 1999

Date of mailing of the international search report

12/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Deffner, C-A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/CH 98/00498

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9902177	A	21-01-1999	AU 7904998	A	08-02-1999
BE 775775	A	16-03-1972	NONE		
US 3814746	A	04-06-1974	FR 2101226	A	31-03-1972
			GB 1329869	A	12-09-1973

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/CH 98/00498

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C07K5/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 99 02177 A (PEPTICHEMIO AG ; MEHLEM FRANCESCO (CH)) 21. Januar 1999 siehe Seite 6 - Seite 9	1-7
A	BE 775 775 A (BELFANTI IST SIEROTERAP MILAN; BELFANTI) 16. März 1972 in der Anmeldung erwähnt	
A	US 3 814 746 A (DE BARBIERI A) 4. Juni 1974 in der Anmeldung erwähnt	

☐

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Mai 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12/05/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Deffner, C-A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH 98/00498

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9902177	A	21-01-1999	AU	7904998 A	08-02-1999
BE 775775	A	16-03-1972	KEINE		
US 3814746	A	04-06-1974	FR	2101226 A	31-03-1972
			GB	1329869 A	12-09-1973